

DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA MÉDICA E PARASITOLOGIA
Diretor: Prof. Dr. Zeférino Vaz

SÔBRE A DETERMINAÇÃO FOTOMÉTRICA DE MICROQUANTIDADES DE MAGNÉSIO

(Adaptação do método do amarelo de tiazol)

(ON THE PHOTOMETRIC DETERMINATION OF SMALL AMOUNTS OF
MAGNESIUM)

(An adaptation of the Titan yellow method)

RUBENS SALOMÉ PEREIRA

Em que pese ao fato de ser indispensável ao desenvolvimento normal dos processos metabólicos, mal se define ainda o papel biológico do magnésio, cuja supressão na dieta chega a determinar a morte.

No decorrer dos nossos trabalhos sobre a composição mineral do sangue de certos invertebrados e a de soluções perfusoras (^{1, 2, 3}), vimo-nos constantemente forçados a determinar o magnésio em quantidades extremamente pequenas de sôro, e tão reduzido por vêzes era êsse elemento na aliquota disponível para a sua determinação, que o método proposto para a sua dosagem (⁴), baseado no isolamento sob forma de oxinato e ulterior copulação da oxina com ácido naftiônico, se revelou de sensibilidade deficiente.

A determinação de quantidades extremamente pequenas de magnésio é operação delicada, pois êsse metal não forma compostos corados diretamente, e em certos processos as várias fases de manipulação abrem campo à introdução de numerosas causas de êrro, de sorte que há inegável vantagem, sempre que possível, na utilização dos complexos de adsorção formados pelo hidróxido de magnésio com certos corantes, dentre os quais o amarelo de tiazol merece citação particular.

Se o magnésio se precipita sob forma de hidróxido em presença duma solução aquosa, diluída, do sal de sódio do ácido dehidrotio-p-toluidina sulfônico, forma-se côr vermelho-alaranjada que, tomadas certas precauções, se presta para fins quantitativos (^{5, 6, 7, 8, 9, 10}).

A reação do amarelo de tiazol com o magnésio não é específica, pois numerosos catiônios a apresentam, e as várias colorações observadas dependem da concentração dos iônios presentes e do corante, assim como do pH da solução. A intensificação da côr devida à influência do cálcio, do bário, do cádmio se deve, provavelmente, à coprecipitação dos mesmos com o magnésio, ao passo que

o crômio, o cobre, o ferro, a prata interferem graças à própria côr, ou à que dão com o hidróxido de sódio. Os corpos que formam hidróxidos solúveis em excesso de soda, como o alumínio, por ex., diminuem a intensidade da coloração dada pelo magnésio graças, provavelmente, à adsorção do aluminato pelo hidróxido de magnésio, de que resulta reduzir-se a adsorção do amarelo de tiazol.

No método proposto por GILLAM, o iônio amônio interfere quando a sua concentração alcança 500 p.p.m.; e o cálcio, se chega a 100 p.p.m.; e o mesmo se dá com os fosfatos.

O método do amarelo de tiazol é simples, extremamente sensível, de fácil execução, o que particularmente o recomenda para a determinação de quantidades extremamente pequenas desse elemento.

MÉTODO

Reagentes necessários:

- a) Solução aquosa de sacarose a 5%;
- b) Solução aquosa de cloridrato de hidroxilamina a 5%;
- c) Solução aquosa de amarelo de tiazol a 0,05%;
- d) Hidróxido de sódio em solução 1 N;
- e) Solução padrão de magnésio.

Em um tubo graduado à altura de 5 e 10 ml põe-se volume conveniente e exatamente medido da solução em que se vai determinar o magnésio, isenta de interferentes em proporção prejudicial, levemente ácida e em que se encontra o referido metal em quantidades variáveis entre 0,3 e 1,5 p.p.m. Ajunta-se o reagente (a) de sorte que o seu volume represente 0,1 do final e em seguida o (b), na razão de 2%. Adiciona-se o reativo (c) na proporção de 2:100 em relação ao volume final da solução corada. Dilui-se, então, com água destilada até cerca de 3/4 do volume total e precipita-se o magnésio por meio do reagente (d), de maneira que, no fim, a normalidade em relação à soda esteja às voltas de 0,1. Agita-se bem o conteúdo do tubo para tornar-se a solução homogênea e determina-se a extinção dada pelo colorímetro fotoelétrico de Klett-Summerson, provido de filtro K-S n.º 54. Um "branco" feito ao mesmo tempo, exatamente sob as mesmas condições, servirá de líquido de compensação. É aconselhável calcular-se a concentração do magnésio a partir da extinção dada por uma alíquota conveniente da solução padrão tratada de modo rigorosamente igual ao descrito.

Se bem que, nas condições dêste método, a côr não se altere sensivelmente dentro, pelo menos, dos 40 minutos iniciais, é preferível que a extinção se meça logo após a formação da laca.

Influência da quantidade de amarelo de tiazol, e do branco dos reativos. — GINSBERG ⁽¹¹⁾ demonstrou que na reação se produz um estado de equilíbrio entre o corante e a laca, e determinou o valor dêsse equilíbrio para concentrações diferentes. A côr não se intensifica indefinidamente, mas estaciona a partir do máximo. A formação da laca obedece às leis da adsorção. Justifica-se a comparação de côres dadas pelo corante e pela laca, mas deve sempre haver excesso de amarelo de tiazol. Como, porém, o corante absorve na região do espectro em que se efetuam as medidas, é conveniente manter-se o reagente (c) em níveis mínimos, compatíveis, por certo, com as condições impostas pelo método. O quadro I permite concluir que, para volume final de 10 ml e concentração até 1 p.p.m. de magnésio, 0,2 ml de reagente (c) é quantidade suficiente. Se bem que maiores volumes de (c) — 0,3, 0,4, 0,5 ml — não alterem os resultados, uma vez que se use como compensação um “branco” conveniente, é preferível usar-se o reativo (c) discretamente, dentro dos limites requeridos pelo método.

QUADRO I

Influência do reagente (c) e do “branco”
Volume da solução corada: 10 ml em todos os casos

| Quantidade de Mg microgramas | Volume de reagente (c) usado — ml | Leitura contra | |
|---------------------------------|--------------------------------------|----------------|--------|
| | | Água destilada | Branco |
| 5 | 0.1 | 48 | 15 |
| 10 | 0.1 | 59 | 26 |
| 5 | 0.2 | 71 | 15 |
| 10 | 0.2 | 86 | 30 |
| 5 | 0.3 | 90 | 15 |
| 10 | 0.3 | 104 | 29 |
| 5 | 0.4 | 116 | 15 |
| 10 | 0.4 | 125 | 30 |
| 5 | 0.5 | 125 | 15 |
| 10 | 0.5 | 139 | 29 |

Influência da quantidade de sacarose. — Se a quantidade de cálcio presente na solução não fôr suficientemente grande para justificar a sua separação sob forma de oxalato, a sacarose se usa, como o recomenda GILLAM, para reduzir a

interferência desse metal, que aumenta a cor dada pelo magnésio. Nenhuma influência prejudicial se observa mesmo quando se usam quantidades cinco vezes maiores de sacarose do que a recomendada acima.

Influência do reagente (b). — O cloridrato de hidroxilamina, cuja função é impedir que a cor esmaça, pode ser ajuntado em largo excesso sem que cause alterações na extinção. Isso se verifica quando se ajuntam volumes progressivamente maiores de (b) à solução em que se vai dosar o magnésio — entre 0,1 e 0,5 ml para volume final corado de 10 ml. Conservando constantes todos os demais fatores, obtivemos sempre a mesma extinção ao usar a água como líquido de compensação.

Influência do reagente (d). — Como a cor vermelho-alaranjada se produz quando se forma o hidróxido de magnésio em presença do corante, é necessário que o metal se precipite completamente sob a referida forma. Eis porque os sais de amônio impedem, ou prejudicam, a reação. Se a solução de magnésio contém quantidade suficiente de sais de amônio, é necessário ajuntar-se tal excesso de soda, ou de potassa, que se obtenha bastante íonio hidróxilo necessário para que o produto de solubilidade se ultrapasse. De sorte que, mesmo em presença de magnésio, é possível que a cor não se desenvolva pela adição de certa quantidade de soda. Ela aparecerá, no entanto, se o hidróxido de sódio for ajuntado em largo excesso. Isso, porém, deve ser evitado, porque a adição excessiva de soda pode produzir certa modificação da cor própria à solução do amarelo de tiazol, capaz de estabelecer confusão com a produzida pelo magnésio. Para que a coloração própria à laca apareça no caso do magnésio, a solução deve apresentar $\text{pH} > 12$, o que se realiza perfeitamente quando se adiciona hidróxido de sódio em proporção tal que o líquido corado, após diluição final, seja 0,1 N em relação ao NaOH. Assim, à solução em que se vai determinar o magnésio ajunta-se soda bastante para neutralizar a acidez presente, em seguida tanta quanta necessária para que a sua concentração no líquido seja 0,1 N.

Influência do volume da solução corada sobre a extinção. — A grandeza da extinção das soluções coradas obtidas de acordo com a técnica descrita, depende também do volume das mesmas, o qual, por seu turno, é variável e dependente da quantidade de magnésio presente. Se a concentração deste for muito grande, o líquido se turva e a transparência lida não corresponde à calculada. Se a relação *magnésio/volume da solução corada* se mantiver dentro dos limites estabelecidos, os resultados analíticos não se alteram pela mudança do volume final, uma vez que se mantenham as devidas relações entre os vários reagentes. É o que o demonstra o quadro II.

QUADRO II

Influência do volume da solução corada sobre a extinção
Compensação: branco

| Quantidade de Mg microgramas | Volume — solução corada ml | Leituras |
|---------------------------------|-------------------------------|----------|
| 5 | 5 | 30-31-30 |
| 10 | 10 | 30-29-30 |
| 50 | 50 | 29-30-31 |
| 100 | 100 | 31-30-30 |

A Lei de Lambert-Beer. — A côr desenvolvida não se deve à formação de composto definido, de sorte que, como se verifica, o sistema não obedece à lei de Lambert-Beer senão dentro de limites muito estreitos, em que haja suficiente excesso de amarelo de tiazol. Os melhores resultados obtivemo-los quando a concentração do magnésio se situava entre 0,3 e 1,2 p.p.m. E', pois, necessário e indispensável manter a quantidade de magnésio dentro desses limites, estabelecidos experimentalmente, a fim de se obterem dados seguros.

A determinação do magnésio na matéria orgânica resolve-se em duas fases principais:

- 1) incineração da substância;
- 2) determinação do magnésio nas cinzas obtidas.

Incineração da substância. — No caso de substâncias relativamente ricas de magnésio, como o sangue de certos animais marinhos, a quantidade a tomar-se para a análise pode ser consideravelmente reduzida, e a técnica descrita em ⁽¹²⁾ pode ser recomendada. Se a percentagem desse metal fôr baixa na substância que se analisa, como é o caso do sôro do sangue humano, por ex., é preferível que se use a técnica de incineração aconselhada em ⁽¹³⁾. O processo de determinação pode ser então inteiramente realizado no mesmo tubo, desde que separações de interferentes não se tornem imperativas.

Findo o ataque nitro-perclórico, e após se haverem destruído os percloratos formados, o resíduo se dissolve, com o eventual auxílio de aquecimento, em cerca de 1 ml de HCl 0,1 N. A partir desse ponto a solução é tratada exatamente de acôrdo com o que foi descrito em "Método". Ao ajuntar-se o reagente (d) é necessário levar-se em conta a acidez clorídrica da solução das cinzas, de sorte que o volume de soda ajuntado seja o necessário e suficiente para neutralizar o ácido presente e para dar finalmente normalidade correspondente a 0,1 N NaOH.

Determinação do magnésio na água do mar. — A dosagem do magnésio na água do mar é extremamente simples quando se usa o método do amarelo de tiazol. Tal como a realizamos comumente, consiste na diluição da amostra por meio de HCl 0,1 N na proporção de 1 volume de água + 9 volumes de ácido, e na tomada de alíquota conveniente em relação ao volume final da solução corada. Em geral, 0,05 — 0,1 ml da diluição para volume total de 10 ml. O desenvolvimento da cor se processa como se descreveu e nenhuma separação prévia de interferentes se torna necessária.

RESULTADOS

A fim de verificar a reprodutibilidade dos resultados fornecidos pelo método de que trata o presente trabalho, fizemos em amostra de água do mar 15 determinações, e os números obtidos encontram-se no quadro III.

A dosagem do magnésio feita na mesma água, após separação do cálcio sob forma de oxalato, por via gravimétrica, como oxinato, revelou a presença de 127,90 mg do metal em 100 ml de água. Os resultados fornecidos pelos dois métodos são, pois, perfeitamente comparáveis.

QUADRO III

Determinação do magnésio em água do mar

| Volume de água tomada para a análise (ml) | Volume final da solução corada (ml) | Leitura | Magnésio em 100 ml de água (mg) |
|---|-------------------------------------|---------|---------------------------------|
| 0.005 | 10 | 19 | 126,66 |
| 0.005 | 10 | 20 | 133,33 |
| 0.005 | 10 | 19 | 126,66 |
| 0.010 | 10 | 38 | 126,66 |
| 0.010 | 10 | 39 | 130,00 |
| 0.010 | 10 | 38 | 126,66 |
| 0.015 | 25 | 24 | 133,20 |
| 0.015 | 25 | 23 | 127,60 |
| 0.015 | 25 | 23 | 127,60 |
| 0.050 | 50 | 38 | 126,66 |
| 0.050 | 50 | 39 | 130,00 |
| 0.050 | 50 | 38 | 126,66 |
| 0.100 | 100 | 38 | 126,66 |
| 0.100 | 100 | 39 | 130,00 |
| 0.100 | 100 | 39 | 126,66 |
| Média | | | 128,33 |
| Erro médio | | | 2,397 |
| Erro médio da média | | | 0,619 |
| Coeficiente de variação | | | 1,868 |

SUMMARY

The Titan yellow method for the determination of magnesium is applied to the study of magnesium contents of blood serum of human beings, certain marine animals and sea-water.

The method is essentially that of KOLTOFF, as modified by GILLAM, adapted to the determination of the metal on minute quantities of material.

A simple, yet reliable, method of ashing is described, and analysis for sea-water are given.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1944 — Sobre a composição mineral do sangue do "Callinectes danae" Smith e sobre a de um líquido para perfusão. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let.*, S. Paulo, *Zoologia*, 8:147-9
- 2 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1946 — Estudos sobre a composição da água do mar e do soro do sangue do "Callinectes danae" Smith. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let.*, S. Paulo, *Zoologia*, 9:69-85
- 3 — SAWAYA, P. — 1946 — Solução perfusora para "Callinectes danae" Smith. Alguns efeitos dos seus constituintes iônicos sobre o coração. *Bol. Fac. Fil. Ci. Let.*, S. Paulo, *Zoologia*, 9:5-24
- 4 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1945 — Sobre a determinação fotométrica do magnésio nos produtos de origem biológica. *Rev. Fac. Med. Vet.*, S. Paulo, 3(1-2):83-99
- 5 — KOLTHOFF, I. M. — 1927 — Eine neue spezifische Farbreaktion auf Magnesium und eine einfache kolorimetrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Spuren dieses Element. *Bioch. Zeitschr.*, 185:344-8
- 6 — BECKA, J. — 1931 — Über die praktische Anwendung der colorimetrischen Magnesiumbestimmung in der Biochemie. *Bioch. Zeitschr.*, 233:118-28
- 7 — URBACH, C. und BARTH, R. — Stufenphotometrischer Beitrag zur quantitativen Bestimmung des Magnesiums mittels Titangelb nach Kolthoff. *Mikrochemie*, 14:343-61
- 8 — HIRSCHFELDER, A. D., E. F. SERLES and V. G. HAURY — 1934 — A simple adaptation of Kolthoff's colorimetric method for the determination of magnesium in biological fluids. *J. Biol. Chem.*, 104:636-45
- 9 — HAURY, V. G. — 1938 — Modification of the Titan yellow method for the determination of small amounts of magnesium in biological fluids. *J. Lab. Clin. Med.*, 23:1079-84
- 10 — GILLAM, W. S. — 1941 — A photometric method for the determination of magnesium. *Ind. Eng. Chem.*, (Anal. ed.) 13:499-501

- 11 — GINSBERG, H. — 1940 — *Zeitschr. Elektroch.*, **45**:829-33 “in” Chem. Abst., **34**:1934,, 1940
- 12 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1939 — Sur la détermination spectrophotométrique de l'acide phosphorique au moyen de la réaction céruléo-molybdique de Deniges. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **21**:827-35
- 13 — SALOMÉ PEREIRA, R. — 1945 — Photometric determination of potassium in biological materials. *J. Biol. Chem.*, **160**:617-29